

学位論文題名

炎症性タンパク質の遺伝子発現における
転写因子の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

近年の分子生物学的な研究から、腫瘍壊死因子 (TNF- α) やインターロイキン-1 β (IL-1 β) がマクロファージなどの細胞から過剰に産生することが、炎症性疾患や自己免疫疾患の発症・症状の増悪に関係していることが明らかとなってきた。これらのタンパク質の量的な変化は、その遺伝子の転写量の異常が引き金となっていることが考えられ、異常になったタンパク質遺伝子の発現を正常に戻すという戦略は、新しい創薬の切り口になると予想される。転写因子の nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や activator protein-1 (AP-1) は、細胞外から刺激を受けたときに活性化され、炎症や免疫反応の鍵となる多くのタンパク質をコードする遺伝子発現に関与することが知られてきた。従って、NF- κ B や AP-1 の活性化や活性を抑制する薬剤は、炎症性疾患や自己免疫疾患の新しい治療薬になることが期待できる。筆者は、転写因子に働きその活性を制御する薬剤に関する探索研究を行ってきた。その研究結果を、本論文の以下 6 章にまとめる。

第 1 章 簡便で高感度な転写活性測定系である PLAP 遺伝子発現系の構築

転写調節因子の活性化や不活性化に作用する薬剤を研究するためには、簡便で精度の高い転写活性測定法が不可欠である。本章では、この目的を達成するために、レポーター遺伝子に、ヒト胎盤型アルカリホスファターゼ (PLAP) を選択し、PLAP 遺伝子のクローニング、分泌型 PLAP をコードする遺伝子への変換、発光基質 AMPPD を用いた PLAP 活性の高感度測定法について述べる。

第 2 章 LPS 刺激によるヒト TNF- α 遺伝子転写の活性化における NF- κ B の役割

リポポリサッカライド (LPS) 刺激によるマウス TNF- α 遺伝子転写の活性化においては NF- κ B が重要な役割を果たしていることが報告されていた。本章では、ヒト TNF- α 遺伝子転写の活性化における NF- κ B の役割の検討を行った結果について述べる。筆者は、ヒト TNF- α 遺伝子エンハンサー上に 4 ヶ所の NF- κ B 結合配列を見出し、これらの配列に LPS 刺激により細胞内で活性化される p50 と p65 のヘテロダイマーから構成される NF- κ B が結合すること、さらにこれらの領域に変異を導入した TNF- α -PLAP プラスミドを作製し、このプラスミドを一過性に発現させた細胞を LPS 刺激すると転写活性が低下することがわかった。以上の結果から、LPS 刺激によるヒト TNF- α 遺伝子転写の活性化における NF- κ B が必須であることを明らかにした。

第 3 章 ヒト IL-1 β 遺伝子の遺伝子転写の活性化における NF- κ B の役割

LPS 刺激によるヒト IL-1 β 遺伝子発現においては、転写開始部位から -3134~-2729 領域と -131~+12 領域がシスエレメントとして重要であることが報告されている。本章では、

この領域をさらに絞り込むために、ヒト IL-1 β 遺伝子の-3134~-2987 領域中のシスエレメントおよびこの領域に結合する転写因子について詳細に検討した結果について述べる。この領域の欠損遺伝子を作成して、LPS 刺激による転写活性を調べると、-3134~-3059 領域の欠損により転写活性が低下することがわかった。この領域の塩基配列を検索して、2ヶ所の NF- κ B 結合結合配列を見出し、これらの配列に LPS 刺激により細胞内で活性化される p50 と p65 のヘテロダイマーから構成される NF- κ B が結合すること、さらにこれらの領域に変異を導入した TNF- α -PLAP プラスミドを作製し、このプラスミドを一過性に発現させた細胞を LPS 刺激すると転写活性が低下することがわかった。以上の結果から、LPS 刺激によるヒト IL-1 β 遺伝子転写の活性化における NF- κ B が必須であることを明らかにした。

第4章 LPS 刺激による NF- κ B の活性化に及ぼす TNF- α 産生抑制剤 E3330 の影響

E3330 (4-methoxy-4-(3-phosphatephenyl)spiro(1,2-dioxetane-3,2'-adamantane)) は、エーザイ (株) 筑波研究所で合成された新規キノン誘導体であり、LPS で刺激した単球やマクロファージからの TNF- α 産生を抑制する。本章では、E3330 の TNF- α 産生抑制効果のメカニズムを探るために、LPS 刺激による TNF- α 遺伝子の転写活性の上昇及び NF- κ B の活性化に対する E3330 の作用を検討した結果について述べる。筆者は、単球/単球系細胞を用いて E3330 が LPS 刺激による、TNF- α mRNA の転写量の上昇を抑制すること、TNF- α 遺伝子の発現の上昇を抑制すること、NF- κ B の活性化を抑制すること、NF- κ B の抑制タンパク質である I κ B- α のリン酸化を抑制すること、I κ B- α のリン酸化に重要と考えられる活性酸素の産生を抑制することを見出した。以上の結果から、E3330 の TNF- α 産生を抑制する作用は、E3330 が、I κ B- α のリン酸化を抑制することにより NF- κ B の活性化が抑制され、その結果 TNF- α 遺伝子の転写活性が低下し、TNF- α mRNA の産生量が低下したことに基づくと考えられた。E3330 の I κ B- α のリン酸化を抑制には、活性酸素の産生抑制作用が関与している可能性が示唆された。

第5章 LPS 刺激による NF- κ B 活性化に及ぼすコハク酸トコフェロール (TS) の影響

TS が、TNF- α で刺激したヒト T 細胞株のジャーカット細胞において NF- κ B の活性化を抑制することが報告された。本章では、TS の NF- κ B の活性に及ぼす作用が、単球系細胞においても見られ可能性について、LPS 刺激による NF- κ B の活性化と TNF- α 遺伝子の転写活性の上昇に及ぼす TS の影響を検討した結果について述べる。筆者は、単球系細胞を用いて TS が LPS 刺激による、NF- κ B の活性化を抑制すること、TNF- α 遺伝子の発現の上昇を抑制することを見出した。これらの作用は、 α -トコフェロールには見られなかった。さらに TS の作用の特異性を調べると、TS が AP-1 の活性には影響しないこと、ベータアクチン遺伝子の発現を抑制することを見出した。また、実験を通して TS は培養液中で安定であり、細胞内でも未変化体で存在していることがわかった。以上の結果から、TS は単球系細胞においても NF- κ B の活性化を抑制する作用があり、その作用は TS の構造により発揮されていることが明らかとなった。

第6章 AP-1 と AP-1 結合配列を有するオリゴヌクレオチドとの結合を阻害する新規アントラキノ誘導体 K1115A の薬理作用

筆者は、ゲルシフトアッセイを用いた抗炎症剤のスクリーニングの過程で、*Streptomyces griseorubisinosus* (Mer-K1115A) の培養上清中に AP-1 と AP-1 オリゴヌクレオチドとの結合を抑制する新規アントラキノ誘導体、3,8-dihydroxy-1-propylanthraquinone-2-carboxylic acid (K1115A) を見出した。本章では、AP-1 と AP-1 オリゴヌクレオチドとの結合反応に及ぼす K1115A の阻害作用の特異性、また AP-1 が関係すると考えられる反応のラット滑膜細胞のコラゲナーゼ産生、さらに PMA を皮膚へ塗布したマウスの表皮組織における ODC 活性の上昇に及ぼす K1115A の影響を検討した結果について述べる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 澤 滋 治
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

炎症性タンパク質の遺伝子発現における 転写因子の役割に関する研究

生体は、様々な器官や組織が相互に複雑なコミュニケーションをとりながら、生命現象を営んでいる。個々の器官や組織は分化して特別な機能を有するようになった、様々な細胞群から形成されている。近年の分子生物学的な研究から、細胞から分泌されるタンパク質、細胞膜や細胞内に存在するタンパク質の産生や発現と、これらを制御するタンパク質の産生との平衡関係の破綻が、自己免疫疾患を初めとする疾病の発症・症状の増悪に関与する事が明らかになった。特に、炎症性サイトカインのインターロイキン (IL-1 β) や腫瘍壊死因子 (TNF- α) は慢性関節リウマチなどの病態で増加し、症状の増悪に関連することが明らかにされている。これら炎症性タンパク質の遺伝子転写を制御するという戦略は新しい創薬の切り口になると予想される。

本論文は新しい転写活性の測定系を構築し、炎症性タンパク質の発現における転写因子の役割について検討を進めて、下記の成果を挙げた。

1: PALPアッセイ系の構築

著者の開発した系は、従来の転写活性測定系であるCATアッセイに比較し、高感度で、簡便であり、再現性が高く、汎用性の点でも優れたものである。本系は、遺伝子発現を制御する遺伝子配列の解析やけっ所に電子の転写活性を相互比較するために極めて有用な測定系である。

2: ヒトTNF- α 遺伝子発現におけるNF- κ B活性化の重要性

ヒトTNF- α 遺伝子の5-プロモーター領域に、4カ所のNF- κ B結合配列を見いだした。さらに、この4カ所の結合配列のいずれに変異を導入しても、LPS刺激による転写活性化が著しく低下することを明らかにした。ヒト単球をLPS

で刺激するとNF- κ Bが活性化すること、これら4カ所のNF- κ B結合配列に、p50とp50から構成されるNF- κ Bヘテロダイマーが結合することを見いだした。これらの結果は、LPS刺激によるヒトTNF- α 遺伝子の転写活性化においてNF- κ Bの活性化が重要なことを示唆する。

3：ヒトIL-1 β 遺伝子発現におけるNF- κ B活性化の重要性

ヒトIL-1 β 遺伝子エンハンサー領域において、LPS刺激による転写活性化に必須と考えられる領域を明らかにした。さらにゲルシフトアッセイにより2カ所のNF- κ B結合配列を見だし、その領域の遺伝子配列を決定した。ヒト単球をLPS刺激すると、この2カ所のNF- κ B配列にp50とp50から構成されるNF- κ Bヘテロダイマーが結合することを見いだした。この知見は、LPS刺激によるヒトIL-1 β 遺伝子発現においてNF- κ Bの活性化が重要な事象を示唆する。

4：E3330のNF- κ B活性化抑制作用

TNF- α 産生を抑制する化合物としてE3330を発見し、これがNF- κ Bの転写活性の上昇並びにTNF- α のmRNA転写量の上昇を抑制することを見いだした。E3330は、LPS刺激によるI κ B- α のリン酸化を抑制し、NF- κ Bの活性化を抑制する事象を明らかにした。

以上の研究成果は新しい抗炎症薬の開発研究に有力な方法を与えるものであり、博士（薬学）の学位を受けるに値する業績と評価した。